

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : B01D 57/02, G01N 27/26</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/20434</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. November 1992 (26.11.92)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01050</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Mai 1992 (13.05.92)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 41 16 179.3 17. Mai 1991 (17.05.91) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SERVA FEINBIOCHEMICA GMBH & CO. [DE/DE]; D-6900 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DEMHARTER, Manfred [DE/DE]; Peter-Wenzel-Str. 38, D-6900 Heidelberg (DE). LORENZ, Herbert [DE/DE]; Albrecht-Dürer-Str. 2, D-6507 Ingelheim (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p>(74) Anwalt: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; - A Patente -, Postfach 200, D-6507 Ingelheim (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01050</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Mai 1992 (13.05.92)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 41 16 179.3 17. Mai 1991 (17.05.91) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SERVA FEINBIOCHEMICA GMBH & CO. [DE/DE]; D-6900 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DEMHARTER, Manfred [DE/DE]; Peter-Wenzel-Str. 38, D-6900 Heidelberg (DE). LORENZ, Herbert [DE/DE]; Albrecht-Dürer-Str. 2, D-6507 Ingelheim (DE).</p>	<p>(74) Anwalt: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; - A Patente -, Postfach 200, D-6507 Ingelheim (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01050</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Mai 1992 (13.05.92)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 41 16 179.3 17. Mai 1991 (17.05.91) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SERVA FEINBIOCHEMICA GMBH & CO. [DE/DE]; D-6900 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DEMHARTER, Manfred [DE/DE]; Peter-Wenzel-Str. 38, D-6900 Heidelberg (DE). LORENZ, Herbert [DE/DE]; Albrecht-Dürer-Str. 2, D-6507 Ingelheim (DE).</p>	<p>(74) Anwalt: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; - A Patente -, Postfach 200, D-6507 Ingelheim (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p>(54) Title: ELECTROPHORESIS CHAMBER</p> <p>(54) Bezeichnung: ELEKTROPHORESEKAMMER</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="padding-left: 40px;">The invention concerns an electrophoresis chamber constructed from a multiplicity of cooled elements.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="padding-left: 40px;">Die vorliegende Erfindung betrifft eine Elektrophoresekammer, die aus einer Vielzahl gekühlter Elemente aufgebaut ist.</p>				



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenl gungsschrift
⑩ DE 41 16 179 A 1

⑤① Int. Cl.⁵:
B01 D 57/02
C 07 K 3/14

⑳ Aktenzeichen: P 41 16 179.3
㉔ Anmeldetag: 17. 5. 91
㉕ Offenlegungstag: 19. 11. 92

DE 41 16 179 A 1

㉑ Anmelder:
Serva Feinbiochemica GmbH & Co, 6900 Heidelberg,
DE

㉒ Erfinder:
Demharter, Manfred, 6900 Heidelberg, DE; Lorenz,
Herbert, Dipl.-Chem. Dr., 6507 Ingelheim, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉖ Elektrophoresekammer

㉗ Die vorliegende Erfindung betrifft eine Elektrophorese-
kammer, die aus einer Vielzahl gekühlter Elemente aufge-
baut ist.

DE 41 16 179 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Elektrophoresekammer variabler Größe mit modularem Aufbau.

Die Elektrophorese ist eine sehr leistungsfähige analytische Methode für die Trennung von Proteinen, aber man kennt auch zahlreiche Techniken der präparativen Elektrophorese, die jedoch überwiegend für Trennungen in einem Maßstab von Milligramm-Mengen an Proteinen eingesetzt werden. Ein Hauptproblem bei der Maßstabserweiterung ("scale up") ist die Ableitung der beim Stromdurchgang entstehenden Joule'schen Wärme. Um sie abzuleiten, werden unterschiedliche Wege beschritten.

Eine besonders erfolgreiche Technik ist die präparative isoelektrische Fokussierung in Schichten granulierter Gele, mit deren Hilfe Gramm-Mengen von Proteinen mit hoher Auflösung getrennt werden konnten (Radola, B.J., Methods Enzymol. 1984, 104, 256 - 275).

In diesem Trennsystem ist die Schichtdicke auf ca. 1 cm begrenzt, auch kann die Trennstrecke nicht verlängert werden, so daß das Trennvolumen lediglich durch Variation der Breite der Schicht vergrößert werden kann. Einer solchen Maßstabserweiterung sind aber enge praktische Grenzen gesetzt. Auch andere aus der Literatur bekannte präparative Systeme mit zylindrischer Geometrie lassen sich weder bei radialer noch axialer Kühlung in einen größeren Maßstab übertragen (Rilbe, H. und Petterson, S., in: Arbuthnott, J.P. und Beeley, J.A. Isoelectric Focusing, Butterworth, London 1975, pp. 44 - 57).

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Vorrichtung für die präparative Elektrophorese zur Verfügung zu stellen, die die Trennung von größeren Substanzmengen ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird eine Elektrophoresekammer vorgeschlagen, die aus einer Vielzahl kühler Elemente zur Aufnahme eines Trennmediums besteht.

Die erfindungsgemäßen Elemente (1) sind von U-förmiger Struktur, wobei ihre inneren Flächen (2) eine Kammer (3) zur Aufnahme des Trennmediums bilden. Jedes Element enthält mindestens eine Einlaßöffnung (4a) und eine Auslaßöffnung (4b) für das Kühlmittel. Die gegenüberliegenden äußeren Seitenflächen (5) des Elements enthalten Vorrichtungen zum Abdichten der Trennkammer. Dies kann beispielsweise durch in Vertiefungen (6) eingelegte Dichtungen - beispielsweise aus Silikon - erfolgen. Zweckmäßigerweise sind die erfindungsgemäßen Elemente (1) aus einem gut wärmeleitenden Material gefertigt, um die in der Kammer während der Elektrophorese entstehende Wärme gut an das Kühlmedium abzugeben. Geeignete Materialien sind beispielsweise Metalle, wie zum Beispiel Aluminium, Kupfer, Eisen, Messing und andere Legierungen. Es ist selbstverständlich, daß die Elemente in diesen Fällen mit einem elektrisch nicht leitenden Überzug, z. B. aus einem Kunststoff, überzogen sein müssen, um einen elektrischen Kurzschluß zu vermeiden. Im Inneren sind die erfindungsgemäßen Elemente hohl, oder weisen geeignete Kühlflüssigkeitskanäle (7) auf, die Einlaß- und Auslaßöffnung (4a), (4b) miteinander verbinden.

In einer besonderen Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Element im hinteren Bereich - der den Boden der Trennkammer bildet - eine Vorrichtung, durch die ein inertes Gas, z. B. Luft, Stickstoff, Argon in die Trennkammer geblasen werden kann. Die aufsteigenden Gasbläschen sorgen für eine gute Durchmischung des Elektrolyten in dem jeweiligen Element,

wodurch einerseits einem vertikalen Konzentrationsprofil entgegengewirkt wird, und andererseits ein besserer Wärmeaustausch zwischen dem Elektrolyten und den gekühlten inneren Flächen (2) erfolgt.

In der einfachsten Ausführungsform besteht die Vorrichtung aus einem in eine zweite Vertiefung (8) eingelegten Schlauch zum Durchleiten des Gases, der im Bodenbereich (9) des Elementes (1) an seiner oberen Seite kleine Öffnungen (10) zum Austritt der Gasbläschen aufweist. Diese Öffnungen (10) können durch kleine nach oben gerichtete Röhrchen (11) stabilisiert werden.

Selbstverständlich kann eine solche Vorrichtung zur Erzeugung von Gasbläschen auch direkt in die Konstruktion des Elementes (1) integriert werden, so daß beispielsweise der Boden (9) kleine Öffnungen (10) enthält, die mit einem Kanal verbunden sind, durch den das Gas eingeleitet wird.

Hinsichtlich der Abmessungen eines Elementes können folgende Parameter angesetzt werden. Die Trennkammer sollte etwa 8 bis 13 cm in ihrer Breite und Höhe betragen, wobei geringere Werte problemlos erreicht werden können, bei größeren Werten ist die aufzubringende Kühlleistung der limitierende Faktor. Die Tiefe eines Elementes beträgt im allgemeinen 1 bis 2 cm, wobei ein unterer Bereich durch die Materialstärke des verwendeten Materials definiert ist und ein oberer Bereich in Konkurrenz zu dem Bestreben steht, bei vorgegebener Länge der zusammengebauten Elektrophoresekammer eine möglichst große Anzahl von einzelnen Elementen zu integrieren.

Die erfindungsgemäße Elektrophoresekammer besteht neben den einzelnen Elementen (1) aus zwei Endstücken (12) zur Aufnahme der Elektroden (13) und zum Abschluß des Systems.

Obwohl die Ausführung der Elektroden im Rahmen üblicher Ausführungsformen variiert werden kann, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, eine netzartig aufgebaute Elektrode aus platinieren Titanelektroden einzusetzen. Alternativ kann auch eine netzartige Elektrode eingesetzt werden. Ein "grobmaschiges" Netz (1 - 3 mm Maschenweite) aus einem inertem Material (z. B. Kunststoff), wird meanderförmig von einem leitenden Material, bevorzugt einem Platindraht, durchzogen. Geeignet sind ebenfalls Netze, die ausschließlich aus einem Platin- oder Platin-Iridium-Draht geflochten sind. Geeignet sind auch Graphit-Elektroden. Aus Kostengründen sind Netze aus platinieren Titan bevorzugt. Die Fläche der Elektrode entspricht in etwa der Innenfläche (14) der Elemente. Aufgrund der hohen Feldstärke zwischen 50 bis 200 Volt/cm, und der damit verbundenen Gasentwicklung im Elektrodenraum ist es vorteilhaft, wenn die beiden Elemente, die die beiden Elektroden enthalten, ein wesentlich größeres Volumen aufweisen als die anderen Elemente. Hierdurch wird zu starkes Schäumen vermieden.

Zur Aufnahme der Elektroden kann ein Endstück zwei Nuten enthalten, in die die Elektrode eingeschoben wird. Während das Endstück auf der Trennkammer zugewandten Fläche dieselben Konstruktionsmerkmale aufweisen wie ein Element, ist die Rückseite geschlossen, so daß durch Zusammenfügen mehrerer Elemente und zweier Endstücke eine flüssigkeitsdichte Trennkammer gebildet wird.

Die Außenseiten (15) und die Unterseiten (16) der Elemente wie auch der Endstücke können Vorrichtungen, z. B. in Form von Aussparungen enthalten, damit alle Elemente in einer Spannvorrichtung eingepaßt werden können.

Um einer Konvektion während der Trennung entgegenzuwirken, ist es notwendig, die einzelnen Segmente durch halbdurchlässige Trennelemente voneinander abzutrennen.

Dazu können technische Gewebe mit kleiner Porenweite eingesetzt werden wie sie beispielsweise in der deutschen Offenlegungsschrift 37 36 087 beschrieben sind, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird.

Solche feinmaschigen Polyestergerewebe können entweder direkt zwischen zwei Segmente gelegt werden, oder aber auf Rähmchen gezogen in die dafür vorgesehene Nuten der Segmente eingeschoben werden.

Die halbdurchlässigen Trennelemente müssen nach Beendigung der Trennung durch Einschub passender Gummischeiben vollständig voneinander getrennt werden, um die Entleerung der einzelnen Segmente durchführen zu können.

Geeignet sind ebenfalls ultradünne gewebegestützte Polyacrylamidgele oder Agarosegele mit einer Stärke von ca. 0,05 bis 2 mm, bevorzugt 0,05 bis 0,1 mm, die membranartige Eigenschaften aufweisen. Bei Verwendung derartiger netzgestützter Gele ist vor der Fraktionierung keine zusätzliche Abtrennung durch Gummischeiben erforderlich, da durch die Gelschicht eine Vermischung der Segmentinhalte während der Fraktionierung verhindert wird.

Solche dünnen gewebegestützte Gele können auch direkt zwischen zwei Elementen gelegt werden, ohne daß weitere konstruktive Maßnahmen notwendig sind. Infolge des durch die äußere Spannvorrichtung ausgeübten Druckes sind die Gele zwischen den Elementen fixiert.

Beschreibung der Zeichnungen:

Abbildung 1 zeigt eine Aufsicht auf die aus mehreren Elementen (1) und zwei Endstücken (12), die ebenfalls die Elektroden (13) enthalten, bestehende Elektrophoresekammer (A). Die Spanneinrichtung zum Zusammenhalt der Elemente wie auch die elektrischen Einrichtungen sind nicht dargestellt. An den Seiten sind die Auslaß- bzw. Einlaßöffnungen (4a), (4b) für das Kühlmedium dargestellt. Im oberen Endstück und im ersten oberen Element sind beispielhaft die Nuten (17) eingezeichnet, in die nach beendeter Elektrophorese Trennelemente (18) zur Vermeidung von Stoffaustausch in die Nute (17) eingeschoben werden können. Die Trennelemente bestehen aus einfachen Gummischeiben. Abbildung 2 zeigt ein einzelnes Element mit Ein- und Auslaßöffnungen (4a), (4b). Die inneren Flächen (2) der Seiten und die inneren Flächen (2) des Bodenbereichs (9) und mehrere Elemente bilden die Kammer für die Elektrolytlösung. Die äußeren Seitenflächen (5) enthalten nicht dargestellte Vorrichtungen zum flüssigkeitsdichten Abdichten zweier benachbarter Elemente.

Abbildung 3 zeigt einen Schnitt entlang der Achse AA der Abbildung 2. Straffiert dargestellt ist der Kühlflüssigkeitskanal (7), der Ein- und Auslaßöffnungen (4a), (4b) miteinander verbindet.

In Abbildung 4 sind Vertiefungen (6) zur Aufnahme von Dichtungsprofilen, z. B. aus einem Siliconschlauch, dargestellt. Die der Kammer zugewandte Vertiefung 8 enthält einen Siliconschlauch, der im Bodenbereich (9) der Kammer Röhrrchen (11) mit kleineren Öffnungen (10) enthält. Durch diesen Schlauch wird ein inertes Gas in den Bodenbereich zur Durchmischung der Elektrolytlösung geleitet.

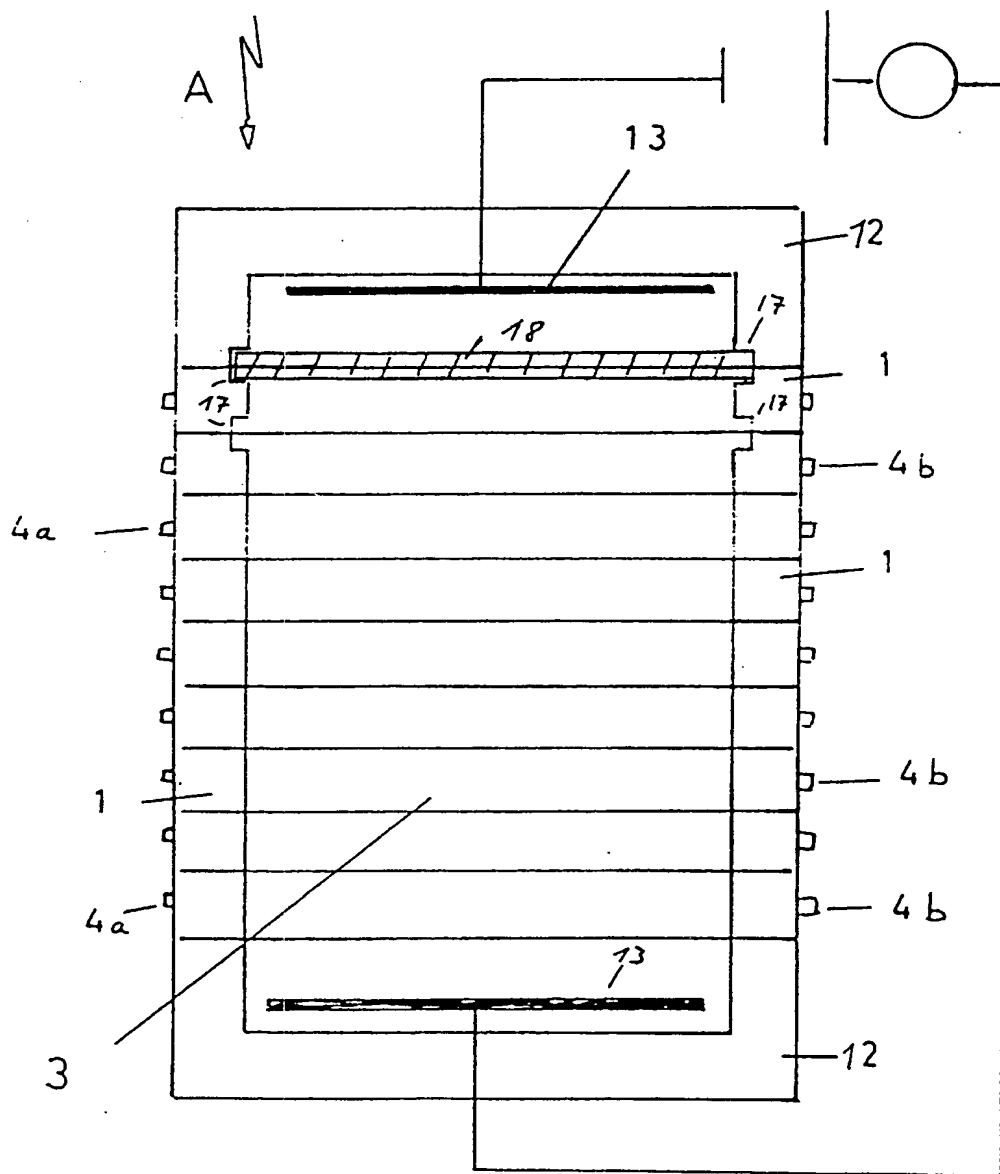
Abbildung 5 zeigt ein Endstück (12) mit Vertiefung (6)

für das Dichtungsprofil und eine Nute (17) für die Elektroden. Die Vertiefungen (8) sind in Abbildung 5 nicht dargestellt.

Patentansprüche

1. Elektrophoresekammer zur Aufnahme einer Elektrolytlösung bestehend aus einer Vielzahl U-förmiger Elemente (1) sowie zweier Abschlußelemente (12) zur Aufnahme der Elektroden, dadurch gekennzeichnet, daß die U-förmigen Elemente Vorrichtungen zur Kühlung ihrer Innenflächen enthalten.
2. Elektrophoresekammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß jedes U-förmige Element im Inneren einen Hohlraum (7) (Kühlflüssigkeitskanäle) aufweist und mindestens eine Einlaßöffnung (4a) und mindestens eine Auslaßöffnung (4b) für ein Kühlmittel enthält, wobei die gegenüberliegenden äußeren Seitenflächen (5) eines Elements (1) Vorrichtungen zum Abdichten der Elektrophoresekammer enthalten.
3. Elektrophoresekammer nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Elemente (1) Vorrichtungen (17) für Trennelemente (18) enthalten, um einen Stoffaustausch zwischen zwei Elementen zu verhindern.
4. Elektrophoresekammer nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennelemente (18) membranartige Eigenschaften aufweisen.
5. Elektrophoresekammer, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Vorrichtung zur Durchmischung der Elektrolytlösung innerhalb jedes Elements enthält.
6. Elektrophoresekammer nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Element (1) in seinem unteren Bereich, der den Boden der Elektrolytkammer bildet, eine Vorrichtung enthält, durch die ein inertes Gas in die Elektrolytkammer geblasen werden kann.
7. Elektrophoresekammer nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung zur Durchmischung gleichzeitig eine Abdichtfunktion erfüllt und zwischen zwei Elementen (1) angeordnet ist.
8. Element zum Aufbau einer Elektrophoresekammer, dadurch gekennzeichnet, daß es eine U-förmige Struktur aufweist, eine Vorrichtung zur Kühlung der Innenflächen, gegebenenfalls eine Vorrichtung zum Durchmischen des Elektrolyten und Vorrichtungen zum flüssigkeitsdichten Abdichten benachbarter Elemente aufweist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen



АВВ. 1

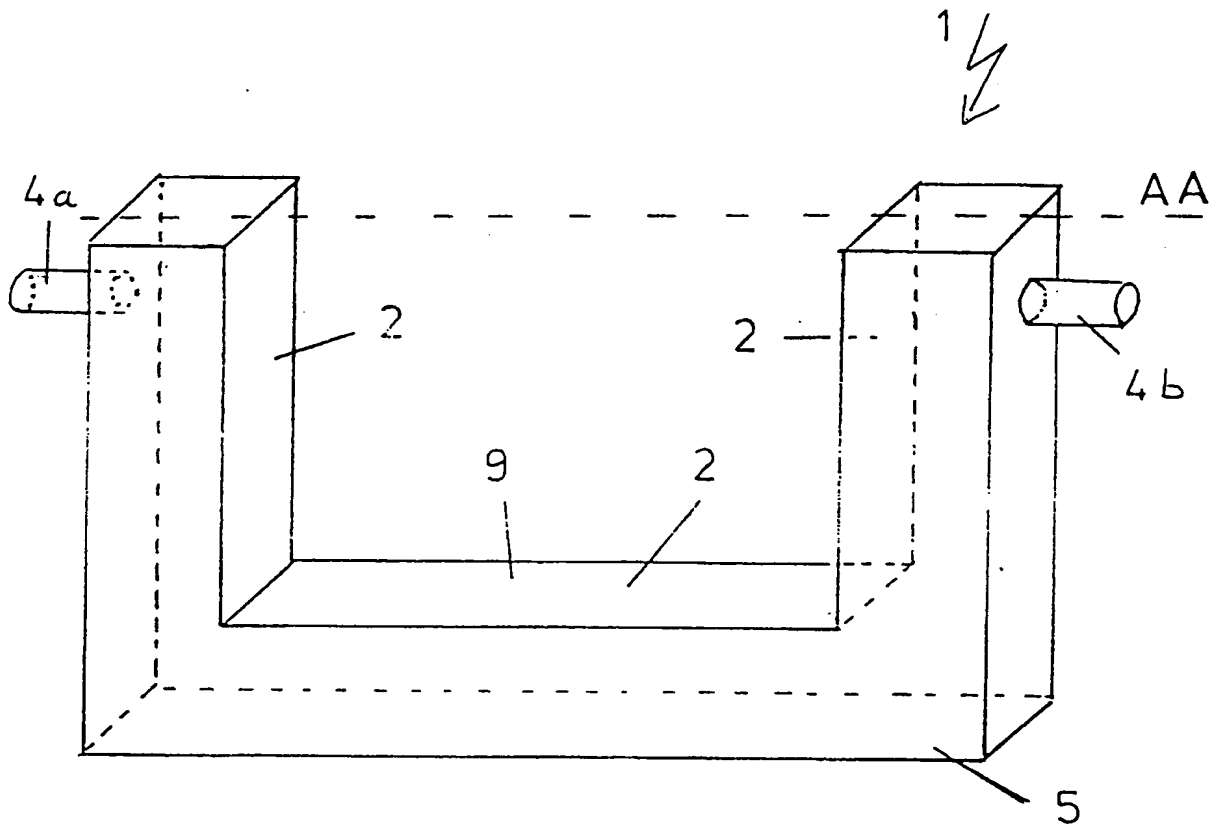


ABB. 2

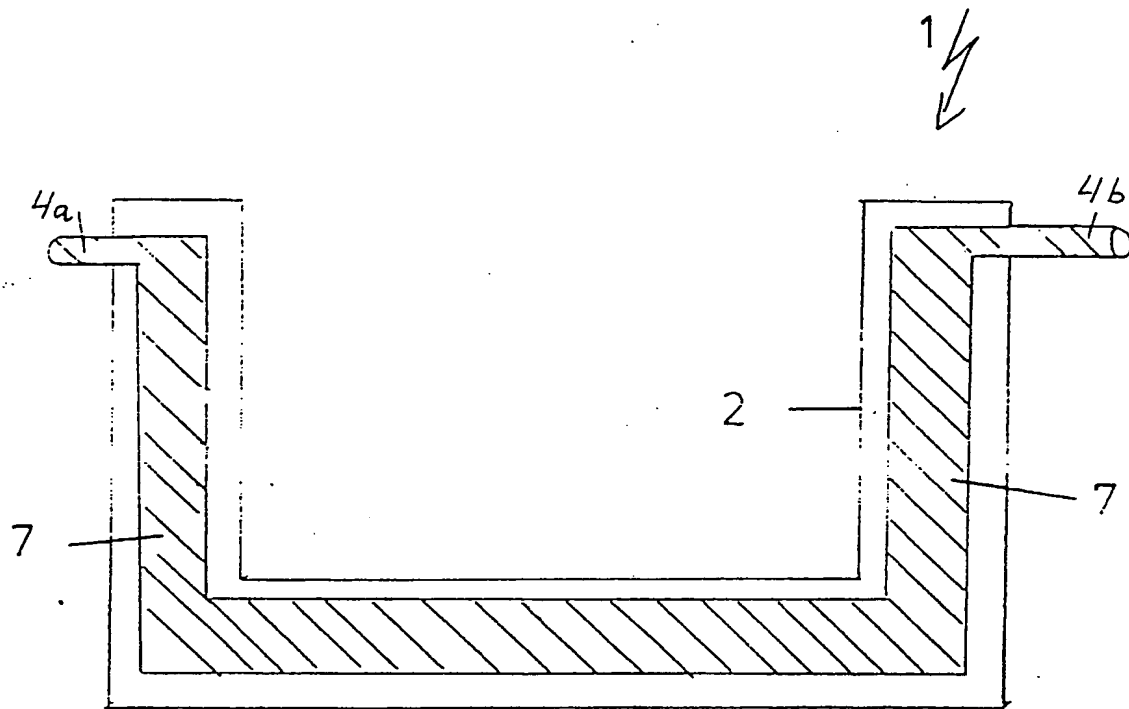


ABB. 3

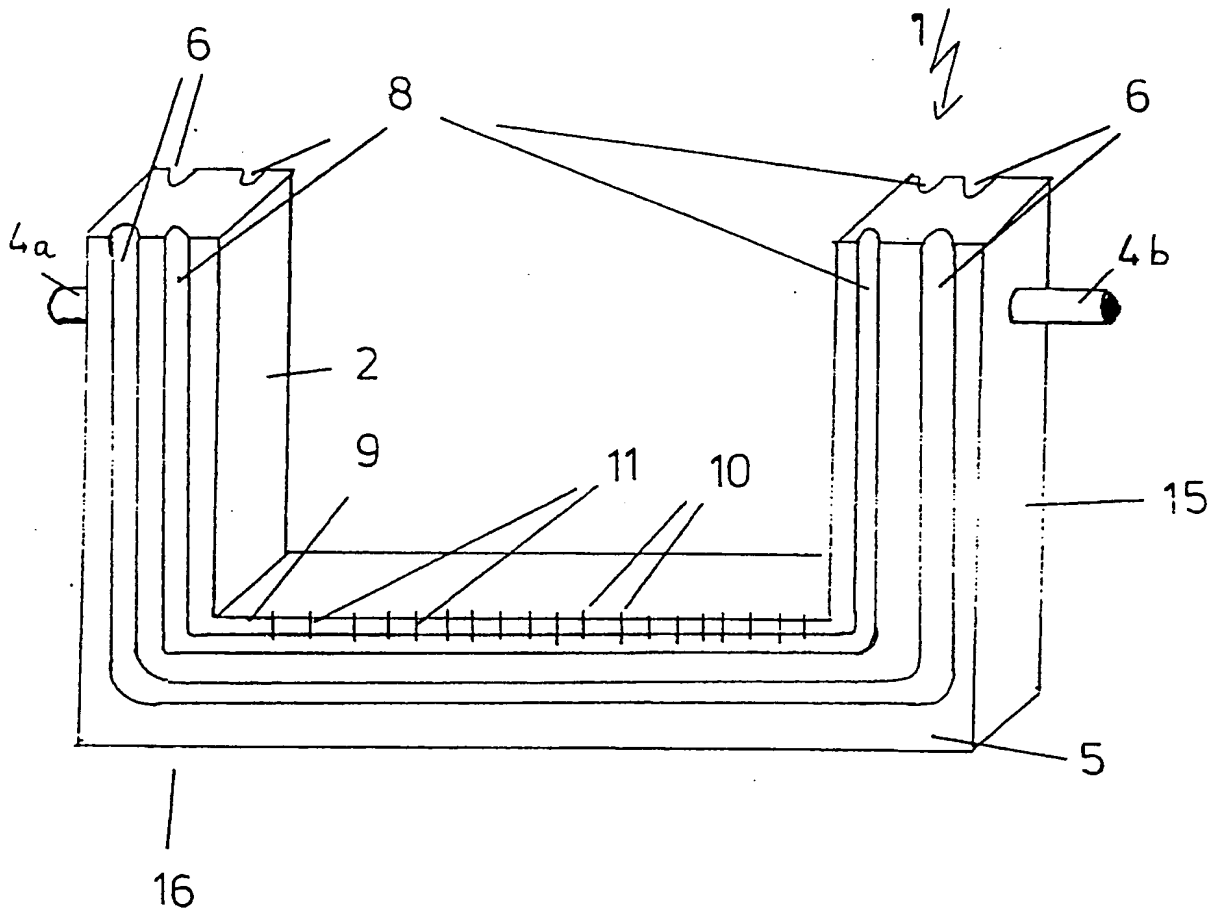


ABB. 4

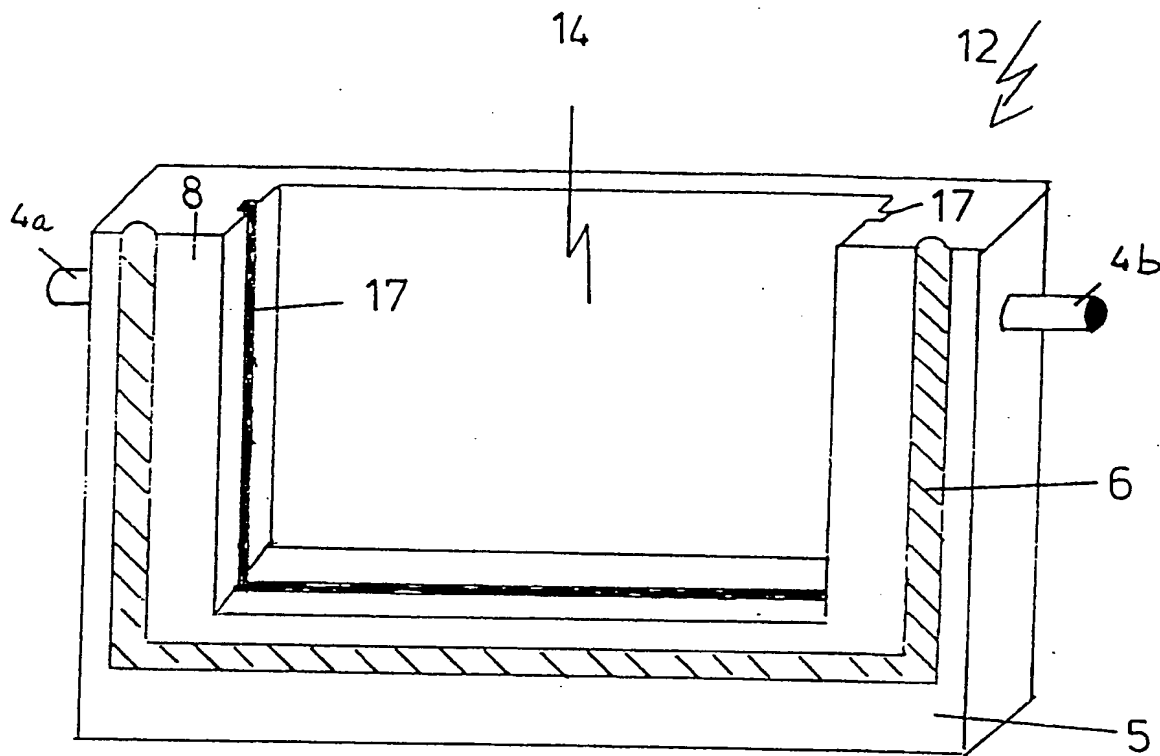


ABB. 5